مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۳۴، شماره ۳، سال ۱۳۹۷

تعیین سطوح پلوئیدی ژنوتیپ‌های لایم منسوب به پرشین‌لایم (*Citrus latifolia* Tanaka) در ایران

Determination of Ploidy Level of Lime Genotypes Known as Persian Lime (*Citrus latifolia* Tanaka) in Iran

حامد حسن‌زاده خانکهدانی[۱]، سمیه رستگار[۲]، بهروز گلعین[۳]، مرتضی گلمحمدی[۴] و عبدالحسین ابوطالبی جهرمی[۵]

۱- دانش‌آموخته دکتری، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، و محقق بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی هرمزگان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران.
۲- استادیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
۳- دانشیار، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر، ایران.
۴- استادیار، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر، ایران.
۵- دانشیار، گروه باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، جهرم، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۵/۲۹

چکیده

حسن‌زاده خانکهدانی، ح.، رستگار، س.، گلعین، ب.، گلمحمدی، م.، و ابوطالبی جهرمی، ع. تعیین سطوح پلوئیدی ژنوتیپ‌های لایم منسوب به پرشین‌لایم (*Citrus latifolia* Tanaka) در ایران. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۴:** ۳۴۰- ۳۲۳.

شیوع بیماری جاروک لیموترش در مناطق عمده پرورش لایم در ایران، تولیدکنندگان را به سمت کاشت گونه لایم تریپلویید مقاوم به این بیماری یعنی پرشین‌لایم ترغیب کرده است تا تولید لایم در جنوب ایران تداوم داشته باشد. در این رابطه، تعداد قابل ملاحظه‌ای از ژنوتیپ‌های ناشناخته لایم توسط باغداران به‌عنوان پرشین‌لایم کشت می‌شود که هیچ اطلاعات ثبت شده‌ای از منشاء، مورفولوژی و زمینه ژنتیکی آن‌ها وجود ندارد. جهت مشخص‌کردن وضعیت رده‌بندی گیاهی ژنوتیپ‌های لایم مشابه با پرشین‌لایم، ۱۸ ژنوتیپ جمع‌آوری شده از استان‌های فارس، هرمزگان و مازندران، با استفاده از روش فلوسایتومتری و ویژگی‌های مورفولوژی در سال ۱۳۹۵ در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان هرمزگان، بندرعباس، مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج فلوسایتومتری نشان داد که ۱۴ ژنوتیپ از ۱۸ ژنوتیپ لایم مورد بررسی، تریپلویید و بقیه دیپلویید بودند. میزان شاخص DNA برای چهار ژنوتیپ دیپلوئید از ۰/۸۹۶ تا ۱/۰۰۰ و در ژنوتیپ‌های تریپلویید از ۱/۳۱۳ تا ۱/۵۶۳ متغیر بود. ژنوتیپ‌های تریپلویید ابعاد برگ بزرگ‌تر و تراکم روزنه و کیسه‌های ترشحی کمتری نسبت به ژنوتیپ‌های دیپلویید داشتند. نتایج نشان داد که ژنوتیپ‌های خارکُل، لیموی‌خیاری و لیموی‌موسوم به مصری (که به اشتباه به‌جای پرشین‌لایم در برخی مناطق جنوبی ایران کشت می‌شود) دیپلوئید می‌باشند و ممکن است به بیماری جاروک لیموترش حساس باشند.

واژه‌های کلیدی: پرشین لاین، تاهیتی‌لایم، تریپلویید، شاخص DNA، کیسه‌های ترشحی.

نگارنده مسئول: srastegar2008@gmail.com تلفن: ۹-۰۷۶۳۳۳۱۳۸۰۶

مقدمه

پرشین‌لایم (*Citrus latifolia* Tanaka) که با عنوان تاهیتی‌لایم یا بیرس‌لایم نیز شناخته می‌شود، یک دورگ تریپلویید مرکبات است که به‌طور گسترده در هند، مکزیک، چین، آرژانتین و برزیل کشت می‌شود (Cantuarias-Avilés *et al*., 2012). پرشین‌لایم، به‌ویژه در سال‌های اخیر، به‌دلیل مقاومت به فیتوپلاسمای بیماری جاروک لیموترش (Witches Broom Disease of Lime = WBDL)، مورد توجه قرار گرفته است (Salehi *et al*., 2005). پرشین‌لایم بدون بذر بوده یا به ندرت تولید بذر می‌کند و احتمالاً دورگ بین لایم و لمون یا بالنگ است (Singh *et al*., 2002). گزارش‌هایی وجود دارد که ژنوتیپ‌های پرشین‌لایم از تلاقی تخمک هاپلویید لمون (*Citrus limon*) و گامت دیپلویید مکزیکن‌لایم (*Citrus aurantifolia*) منشا گرفته‌اند (Curk *et al*., 2016).

بیرس‌لایم که به‌طور تجاری در کالیفرنیا پرورش می‌یابد، با نام‌های مختلفی نظیر باربارا، بیروم‌سیدلس، IAC، پارکر و تانپائو شناخته می‌شود (Cottin, 2002)، بنابراین، بیرس‌لایم و IAC، ژنوتیپ‌های مشابه پرشین‌لایم هستند. از طرفی، گزارش شده است که تانپائولایم یک ژنوتیپ تریپلویید از مکزیکن‌لایم بوده که احتمالاً از تلاقی برگشتی بین گونه‌ای (یک تخمک دیپلویید مکزیکن‌لایم بارور شده با بالنگ) ایجاد شده است (Curk *et al*., 2016). با این‌حال، گزارش شده است که بیرس‌لایم و پرشین‌لایم دو واریته مجزا هستند، هر چند مشابهت‌هایی در شکل میوه دارند (Hodgson, 1967).

اهمیت پلی‌پلوئیدی در کشاورزی به‌خوبی شناخته شده است. گیاهان پلی‌پلویید دارای سازگاری اکولوژیکی بیشتری بوده و امکان استقرار و بقاء تحت شرایط سخت را دارند. همچنین، به‌نظر می‌رسد پلی‌پلوئیدی باعث افزایش فعالیت ژنی و تنوع آنزیمی، سرعت فتوسنتز بالاتر همگام با تنفس کمتر، سرعت رشد کمتر اما تحمل بیشتر به تنش‌های شوری، خشکی و تغذیه‌ای و افزایش مقاومت به بیماری‌ها می‌شود (Lavania, 2005).

سطوح پلی‌پلوئیدی نظیر تری‌پلوئید، تتراپلوئید، پنتاپلوئید، هگزاپلوئید و اکتاپلوئید در گونه‌های مختلف مرکبات به‌طور معمول وجود دارند (Longley, 1925). گیاهان پلی‌پلوئید، اغلب فنوتیپ جدیدی نشان داده و صفت مورد نظر در اجداد خود را در برخی ویژگی‌ها نظیر تحمل به خشکی، نامیزیدن، مقاومت به آفت و تولید زیست‌توده، شدیدتر بروز می‌دهند. این ویژگی‌ها، شانس این گیاهان را برای ورود به برنامه‌های به‌نژادی در کشاورزی افزایش می‌دهند (Shahriari-Ahmadi *et al*., 2008).

تکنیک‌های مختلفی برای تعیین سطح پلوئیدی در گیاهان وجود دارد که عبارتند از:

روش‌های مستقیم نظیر شمارش کروموزومی و روش‌های غیرمستقیم شامل فلوسایتومتری و استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی. یکی از روش های تعیین سطح پلوییدی، روش معمول شمارش کروموزومی در سلول‌های مریستم ریشه است که کاری وقت‌گیر و تخصصی بوده و نیازمند تعداد زیادی بذر سالم است (Ghanavati and Eskandari, 2011). از طرفی با توجه به تریپلوئید بودن پرشین‌لایم و عدم تولید بذر، دسترسی به ریشه در آن با کشن بذر امکان‌پذیر نبوده و انجام روش شمارش کروموزومی تنها با انجام کشت درون شیشه‌ای آن و تولید ریشه در شرایط کشت بافت میسر می‌باشد.

فلوسایتومتری یک روش سریع و با ارزش در تعیین محتوای DNA و سطح پلوئیدی گیاهان است که اندازه‌گیری محتوای DNA را در حجم زیادی از هسته‌های سلول امکانپذیر می‌کند (Seker *et al.*, 2003). استفاده از تکنیک فلوسایتومتری به‌عنوان یک روش آسان و سریع برای تعیین سطح پلوئیدی در گونه‌های مرکبات استفاده شده است (Aleza *et al.*, 2010). بررسی تعداد کلروپلاست‌ها در سلول‌های محافظ روزنه، اندازه روزنه و تعداد آن‌ها نیز از دیگر روش‌هایی است که در تعیین سطح پلوئیدی گیاهان کاربرد دارد.

به‌طور معمول با افزایش سطح پلوئیدی، تعداد روزنه در واحد سطح برگ کاهش یافته ولی اندازه سلول محافظ روزنه افزایش می‌یابد (Yuan *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2010; Malekzadeh-Shafaroodi *et al.*, 2011; Hosseini *et al.*, 2014). در جنس سیتروس (Citrus)، تراکم و اندازه روزنه در چندین گونه نظیر گریپ‌فروت مارش، لمون، پرتقال والنسیا، نارنج (Germana *et al.*, 2002) و نارنگی کینو (Jaskani *et al.*, 2002) مورد بررسی قرار گرفته است.

این روش ها همچنین به‌عنوان نشانگر های ریخت شناسی برای شناسایی سطح پلوئیدی در گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرند. در بررسی سطح پلوئیدی نارنگی کلمانتین با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری مشخص شده است که یک رابطه مثبت بین سطح پلوئیدی و طول و عرض سلول های محافظ روزنه وجود دارد و تراکم روزنه به‌طور منفی تحت تأثیر سطح پلوئیدی قرار می‌گیرد (Padoan *et al.*, 2013).

در یک پژوهش، برای تعیین سطح پلوئیدی پایه‌های مختلف مرکبات، از تاهیتی‌لایم به عنوان گیاه استاندارد تریپلوئید در روش فلو سایتومتری استفاده شد و دریافتند که همه پایه‌های مورد بررسی دیپلویید هستند. مقدار DNA هسته‌ای تاهیتی‌لایم ۱/۱۷۰ پیکوگرم و مقدار DNA هسته‌ای پایه‌های مورد بررسی از ۰/۹۸۴ پیکوگرم در گونه هیوکان (*Citrus ampullacea*) تا ۰/۶۷۸ پیکوگرم در نارنج سه‌برگ تخمین زده شد (Seker *et al.*, 2003).

علاوه بر ویژگی‌های بارز پرشین‌لایم و پتانسیل رقابتی آن با مکزیکن‌لایم، این گونه لایم به فیتوپلاسمای بیماری جاروک لیموترش مقاوم است و تاکنون علایمی از بیماری در شرایط طبیعی روی آن مشاهده نشده است (Salehi *et al*., 2005). بر این اساس، گرایش به پرورش پرشین‌لایم در جنوب ایران افزایش یافته است.

از این رو، به‌منظور جلوگیری از کشت ژنوتیپ های دیگر لایم، که از لحاظ ظاهری مشابه پرشین‌لایم بوده و در تحمل آن‌ها به بیماری جاروک لیموترش تردید وجود دارد، تعیین اصالت این گونه لایم ضروری به‌نظر می‌رسد. با توجه به تریپلوئید بودن پرشین‌لایم، تعیین سطح پلوئیدی ژنوتیپ‌های مشابه با این گونه مرکبات می‌تواند به‌عنوان یکی از روش‌های تعیین اصالت آن‌ها مطرح باشد. هدف از پژوهش حاضر، بررسی سطح پلوئیدی ژنوتیپ‌های منسوب پرشین‌لایم و تعیین اصالت آن‌ها بود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۸ ژنوتیپ شامل ۱۴ ژنوتیپ شناخته شده و نا شناخته منسوب به پرشین‌لایم (*Citrus latifolia* Tanaka)، مکزیکن‌لایم (*C. aurantifolia* Swingle) به‌عنوان گیاه استاندارد دیپلوئید، لیموی‌خیاری و دو ژنوتیپ ناشناخته لایم (*Citrus* sp.)، در سال ۱۳۹۵ در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی هرمزگان انجام شد (جدول ۱). بدین‌منظور، نمونه‌های برگ ژنوتیپ‌های مذکور، از باغات مرکبات استان‌های هرمزگان (رودان و میناب)، فارس (جهرم و داراب) و مازندران (رامسر و ساری) جمع‌آوری شد. برگ‌های جمع‌آوری‌شده، جهت بررسی ویژگی‌های ریخت شناسی برگ، تعداد روزنه و کیسه‌های ترشحی و برای آزمون فلوسایتومتری مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی صفات ریخت‌شناسی برگ

برگ‌های جوان و بالغ جمع‌آوری و در پلاستیک زیپ‌دار در یونولیت حاوی یخ خشک، به آزمایشگاه منتقل شد. در طول انتقال از تماس مستقیم نمونه‌های برگ با یخ خشک جلوگیری شد. ابعاد برگ (طول و عرض) با استفاده از خط‌کش بر حسب میلی‌متر در ۱۲ برگ بالغ اندازه‌گیری شد.

تراکم روزنه

به‌منظور مقایسه تعداد روزنه‌ها، برگ‌های بالغ مورد استفاده قرار گرفت. در گونه‌های مرکبات، روزنه‌ها فقط در سطح زیرین برگ مشاهده می‌شوند و در سطح رویی برگ هیچ روزنه‌ای وجود ندارد (Padoan *et al*., 2013). جهت آماده‌سازی اپیدرم سطح زیرین برگ، ناحیه بین رگبرگ اصلی و حاشیه برگ، با استفاده از لاک بی‌رنگ به‌صورت یکنواخت

جدول ۱- ژنوتیپ‌های لایم منسوب به پرشین لایم مورد مطالعه

Table 1. Evaluated lime genotypes knowen as Persian lime

Local name of genotype	نام محلی ژنوتیپ	علامت اختصاری Abbreviation	نام علمی Scientific name	Collecting location
Darab Persian lime	پرشین‌لایم داراب	IFD	*Citrus* sp.	Agricultural Garden- Darab- Far
Cucumber shape lime	لیموی‌خیاری	CuL	*Citrus* sp.	
Forg-e-Darab Persian lime	پرشین‌لایم فورگ داراب	IFDF	*Citrus* sp.	Forg- Darab- Iran
Aboutalebi Persian lime	پرشین‌لایم ابوطالبی	IFJAb	*Citrus* sp.	Mohammad Abad- Jahrom- Fars
Amirsalari Persian lime	پرشین‌لایم امیرسالاری	IFJAm	*Citrus* sp.	Sadegh Abad- Jahrom- Fars- Ira
Kharkol	خارکُل	IFJKh	*Citrus* sp.	
Andishmand 1 Persian lime	پرشین‌لایم اندیشمند ۱	IFJAn1	*Citrus* sp.	Hossein Abad Ghebleh- Jahrom-
Andishmand 2 Persian lime	پرشین‌لایم اندیشمند ۲	IFJAn2	*Citrus* sp.	
Kamali Persian lime	پرشین‌لایم کمالی	IFJK	*Citrus* sp.	Tang-e-Balouchi- Jahrom- Fars-
Egyption lime	لیموی به مصری	IFJKMes	*Citrus* sp.	
Mexicum line (standard diploid)	مکزیکن‌لایم (استاندارد دیپلوئید)	MX	*Citrus aurantifolia*	Bandemolla- Roudan- Hormoza
Azhdari 1 Persian lime	پرشین‌لایم اژدری ۱	IHRA1	*Citrus* sp.	
Azhdari 2 Persian lime	پرشین‌لایم اژدری ۲	IHRA2	*Citrus latifolia*	
Azhdari 3 Persian lime	پرشین‌لایم اژدری ۳	IHRA3	*Citrus* sp.	
Deperse lime	دیپرس‌لایم	DepL	*Citrus latifolia*	Agricultural Research Station- M Hormozagan- Iran
Tahiti lime (triploid standard)	تاهیتی‌لایم (استاندارد تریپلوئید)	TL	*Citrus latifolia*	
Bearss lime	بیرس‌لایم	BL	*Citrus latifolia*	Fajr Sari Horticulture Company- Mazandaran- Iran
IAC	IAC	IAC	*Citrus latifolia*	Citrus and Sub-tropical Fruits Re Ramsar- Mazandaran- Iran

آغشته شد. پس از چند دقیقه، غشاء خشک‌شده با دقت با استفاده از نوار چسب برداشته و روی لام میکروسکوپ قرار داده شد (Golein *et al*., 2015). جهت بهبود بزرگنمایی ۱۰۰ برابر میکروسکوپ، از یک قطره روغن ایمرسیون استفاده شد و تعداد روزنه‌ها در ۱۲ نمونه برگ از هر ژنوتیپ در سه میدان دید مختلف شمارش گردید.

تراکم کیسه‌های ترشحی برگ

کیسه‌های ترشحی به‌آسانی و با چشم غیرمسلح در برگ مرکبات قابل رویت می‌باشد. با این حال، کیسه‌های ترشحی در سطح رویی برگ بهتر از سطح زیرین برگ قابل مشاهده بود. جهت شمارش کیسه‌های ترشحی، یک نمونه میکروسکوپی از ۱۲ نمونه برگ بالغ از هر ژنوتیپ تهیه و در سه میدان دید مختلف، تعداد کیسه‌های ترشحی در بزرگنمایی ۴ برابر شمارش شد.

تجزیه فلوسایتومتری

بدین منظور از دستگاه فلوسایتومتر (Partec PA, Germany) مجهز به لامپ arc-UV) طبق روش گا و همکاران (Gu *et al*., 2005) با تغییراتی جزئی استفاده شد. نمونه‌های یک سانتی‌متر مربعی برگ (بدون رگبرگ اصلی) هر یک از ژنوتیپ‌های مورد بررسی، به‌همراه نمونه استاندارد دیپلوئید (مکزیکن‌لایم)، با استفاده از تیغ نازک در پتری‌دیش پلاستیکی در حضور ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج هسته (محلول A کیت دستگاه Partec) به قطعات بسیار ریز خرد شد، به‌طوری که بافت برگ له نشد.

پس از عبور سوسپانسیون حاصل از فیلترهای ۳۰ میکرومتری مجهز به توری نایلونی، ۱/۶ میلی‌لیتر محلول رنگ‌آمیزی هسته (DAPI: ۴،۶-دی‌آمیدینو-۲-فنیل‌ایندول)، سه قطره پلی‌وینیل‌پیرولیدون ۲ درصد و پنج قطره آسکوربیک‌اسید یک درصد به آن اضافه و پس از گذشت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه، نمونه‌ها به‌طور مستقیم در لوله دستگاه فلوسایتومتری قرار داده شدند. محتوای DNA نمونه‌ها در Gain = 510 اندازه‌گیری شد. سطوح پلوئیدی با استفاده از شاخص DNA (DI) و براساس فرمول زیر محاسبه گردید (Hosseini *et al*., 2014; Bakshi *et al*., 2010):

رابطه (۱): $$DI = \frac{\text{Mode x}}{\text{Mode St}}$$

که در آن Mode x برابر مُد خروجی دستگاه برای نمونه مجهول و Mode St برابر مُد خروجی دستگاه برای نمونه استاندارد دیپلوئید بود. بر این اساس، شاخص DNA نمونه‌های دیپلوئید بایستی کمتر یا مساوی یک باشد (1≥). با توجه به در دست‌داشتن محتوای DNA تاهیتی‌لایم (۱/۱۷۰ پیکوگرم) به‌عنوان یک نمونه مشخص (Seket *et al*., 2003)، محتوای DNA برای هر نمونه براساس فرمول (۲) محاسبه گردید:

رابطه (۲): $$Q = R(\frac{E}{S})$$

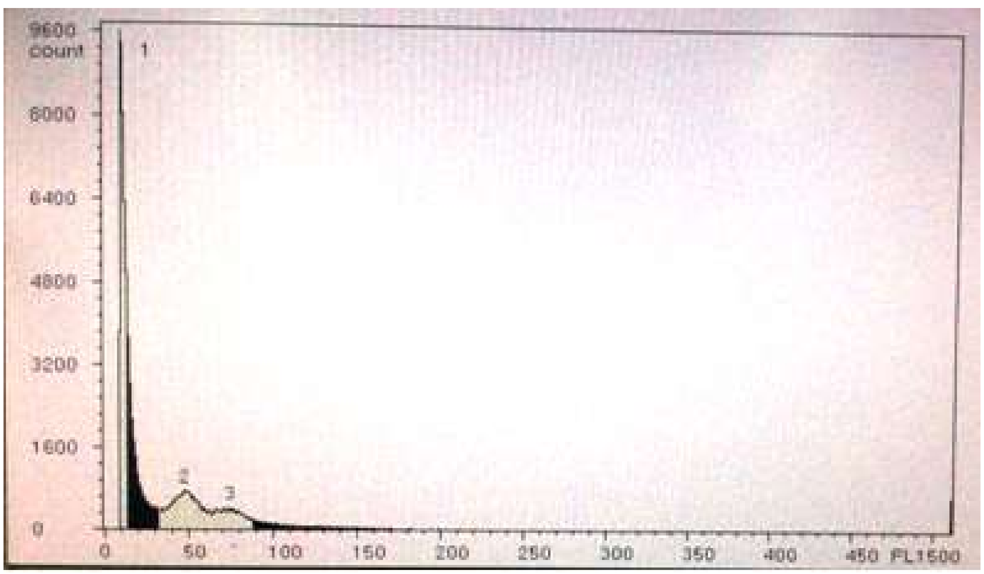
که در آن Q برابر محتوای DNA نمونه

مجهول بر حسب پیکوگرم، R برابر محتوای DNA نمونه استاندارد (۱/۱۷۰ پیکوگرم)، E برابر میانگین پیک فلوسایتومتری نمونه مجهول و S برابر میانگین پیک فلوسایتومتری نمونه استاندارد (۶۶/۹۱) بود. تجزیه های آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 انجام و میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال یک درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

تجزیه فلوسایتومتری

در مرکبات استفاده از برگ‌های جوان (کاملاً رشد یافته) بافت مناسبی برای انجام فلوسایتومتری هستند. هیستوگرام سوسپانسیون مخلوط مکزیکن‌لایم (دیپلوئید) و IFJAm (تریپلوئید) در شکل ۱ نشان داده شده است. در هیستوگرام به‌دست‌آمده، دو پیک بزرگ مربوط به فاز G_1 هر دو گونه گیاهی قابل مشاهده است. نتایج به‌دست آمده از تجزیه فلوسایتومتری نشان داد که ۱۴ ژنوتیپ گیاهی مورد بررسی تریپلوئید و بقیه دیپلوئید بودند. مُد هیستوگرام برای نمونه استاندارد دیپلوئید (مکزیکن‌لایم) و تریپلوئید (تاهیتی‌لایم) به ترتیب ۴۷/۹۴ و ۶۶/۹۱ بود (شکل ۱).



شکل ۱- هیستوگرام سوسپانسیون مخلوط ژنوتیپ‌های مکزیکن‌لایم (دیپلوئید) و IFJAm (تریپلوئید)
Fig. 1. Histogram of mixed suspension of Mexican lime (diploid) and IFJAm (triploid) lime genotypes

با توجه به نسبت محتوای DNA (نسبت محتوای DNA نمونه استاندارد تریپلوئید به محتوای DNA نمونه مورد نظر)، ژنوتیپ‌های مورد بررسی به دو گروه دیپلوئید و تریپلوئید تقسیم‌بندی شدند. بر این اساس، نمونه‌هایی که نسبت محتوای DNA آن‌ها بزرگ‌تر یا مساوی

۱/۳۹۶ بود، به‌عنوان دیپلوئید و بقیه به‌عنوان نمونه‌های تریپلوئید گروه‌بندی شدند (Seker *et al*., 2003).

نسبت محتوای DNA نشان داد که فقط لیموی موسوم به مصری، خارکُل و لیموی خیاری دیپلوئید و بقیه ژنوتیپ‌های مورد بررسی تریپلوئید بودند. براساس شاخص DNA نیز مشخص شد که ژنوتیپ های فوق در گروه دیپلوئید قرار گرفتند. با توجه به شباهت بسیار زیاد این ژنوتیپ‌ها به مکزیکن‌لایم، به نظر می‌رسد این ژنوتیپ‌ها، از دانهال‌های جنسی مکزیکن‌لایم منشاء گرفته باشند. محدوده شاخص DNA در این ژنوتیپ‌ها ۱/۰۰۰-۰/۸۹۶ و در ژنوتیپ های تریپلوئید ۱/۵۶۳-۱/۳۱۳ بود (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج تجزیه فلوسایتومتری برای ژنوتیپ‌های لایم منسوب به پرشین لایم

Table 2. Flow cytometry results for lime genotypes known as Persian lime

ژنوتیپ Genotype	مُد Mode	میانگین Mean	محتوای DNA (پیکوگرم) DNA content (pg)	نسبت محتوای DNA DNA content ratio†	شاخص DNA DNA index††	سطح پلوییدی Ploidy level
IFD	69	69.40	1.214	0.964	1.438	3x
IFDF	69	68.75	1.202	0.854	1.438	3x
IFJAb	73	73.78	1.290	0.907	1.521	3x
IFJAm	74	74.19	1.297	0.902	1.542	3x
IFJAn1	71	70.59	1.234	0.948	1.479	3x
IFJAn2	75	73.69	1.289	0.908	1.563	3x
IFJK	74	72.79	1.273	0.919	1.542	3x
IFJKh	43	43.45	0.760	1.540	0.896	2x
IFJKMes	48	46.30	0.810	1.445	1.000	2x
CuL	44	43.68	0.764	1.532	0.917	2x
MX	48	47.94	0.838	1.396	1.000	2x
IHRA1	64	62.63	1.090	1.073	1.333	3x
IHRA2	65	63.89	1.117	1.047	1.354	3x
IHRA3	63	62.54	1.094	1.070	1.313	3x
DepL	65	64.55	1.129	1.037	1.354	3x
TL	67	66.91	1.170	1.000	1.396	3x
BL	64	59.00	1.032	1.134	1.333	3x
IAC	66	65.72	1.149	1.018	1.375	3x

†نسبت محتوای DNA: نسبت محتوای DNA ژنوتیپ تریپلوئید (تاهیتی‌لایم) به محتوای DNA ژنوتیپ‌های مورد مطالعه.

†DNA content ratio: Ratio of triploid genotype (Tahiti lime) DNA content to the evaluated genotype.

††شاخص DNA: نسبت مُد ژنوتیپ‌های مورد بررسی به مُد ژنوتیپ دیپلوئید (مکزیکن‌لایم).

††DNA index: Ratio of the evaluated genotype mode to diploid genotype (Mexican lime) mode.

* برای اختصارات به جدول ۱ مراجعه شود.

* For abbreviations refer to Table 1.

براساس مقایسه‌های گروهی انجام‌شده بین ژنوتیپ‌های دو گروه دیپلوئید و تریپلوئید،

متوسط مُد فلوسایتومتری در گروه تریپلوئید (۶۷/۲) به طور معنی‌داری بیشتر از گروه دیپلوئید (۴۵/۸) بود. در خصوص میانگین فلو سایتومتری نیز نتایج مشابهی حاصل شد (۶۷/۷ در مقابل ۴۵/۳). در خصوص سه پارامتر محتوای DNA، نسبت محتوای DNA و شاخص DNA نیز مقادیر به‌دست‌آمده در گروه تریپلوئید (به ترتیب ۱/۱۸۴ پیکوگرم، ۰/۹۸۴ و ۱/۴۲۷) به طور معنی‌داری بیشتر از گروه دیپلوئید (به ترتیب ۰/۷۹۳ پیکوگرم، ۱/۴۷۸ و ۰/۹۵۳) بود (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسه گروهی ژنوتیپ‌های دیپلوئید و تریپلوئید لایم بر اساس نتایج فلوسایتومتری

Table 2. Group comparison of diploid and triploid lime genotypes using the results of flow cytometry

Flow cytometry parameter	پارامتر فلوسایتومتری	Genotype group گروه ژنوتیپ		F value	P value
		دیپلوئید Diploid	تریپلوئید Triploid		
Mode	مُد	45.8 ± 0.79	67.2 ± 0.65	17.54**	<0.0001
Mean	میانگین	45.3 ± 0.59	67.7 ± 0.74	15.69**	<0.0001
DNA content (pg)	محتوای DNA (پیکوگرم)	0.793 ± 0.010	1.184 ± 0.013	15.69**	<0.0001
DNA content ratio	نسبت محتوای DNA	1.478 ± 0.019	0.984 ± 0.012	19.53**	<0.0001
DNA index	شاخص DAN	0.953 ± 0.016	1.427 ± 0.014	17.51**	<0.0001

**: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

** : Significant at the 1% probability level.

ویژگی‌های ریخت‌شناسی برگ

مقایسه میانگین ابعاد برگ نشان داد که نوع موسوم به مصری، لیموی‌خیاری، مکزیکن‌لایم و خارکُل (به ترتیب ۵۹، ۶۸، ۷۴ و ۷۴ میلی‌متر) دارای طول برگ کمتری بودند. در مقابل طول برگ در ژنوتیپ‌های منسوب به پرشین‌لایم بیشتر از بقیه گونه‌های مورد بررسی بود. بیشترین طول برگ در IAC، بیرس‌لایم، IHRA1 و IFJAn2 (به ترتیب ۱۱۳، ۱۲۰، ۱۱۱ و ۱۰۹ میلی‌متر) مشاهده شد (جدول ۴).

عرض برگ در نوع موسوم به مصری، مکزیکن‌لایم، لیموی‌خیاری، خارکُل کمتر (به‌ترتیب ۳۹، ۴۰، ۴۰ و ۶۵ میلی‌متر) مشاهده شد. از طرفی IAC، بیرس‌لایم، IFJAm و IFJK (به‌ترتیب ۶۷، ۶۷، ۶۴ و ۶۰ میلی‌متر) دارای عرض برگ بیشتری بودند (جدول ۴). در مجموع، میانگین طول و عرض برگ در گیاهان تریپلوئید (به ترتیب ۹۷ و ۵۶ میلی‌متر) بیشتر از گیاهان دیپلوئید (به‌ترتیب ۶۹ و ۴۱ میلی‌متر) بود.

جدول ۴- مقایسه میانگین ابعاد برگ، تراکم روزنه و کیسه‌های ترشحی در ژنوتیپ‌های لایم منسوب به پرشین لایم

Table 4. Mean comparison of leaf dimensions, stomatal and secretory sac density in lime genotypes known as Persian lime

ژنوتیپ Genotype	طول برگ (میلی‌متر) Leaf length (mm)	عرض برگ (میلی‌متر) Leaf width (mm)	تراکم روزنه (۱۰۰x) Stomatal density (100x)	تراکم کیسه ترشحی (۴x) Secretory sac density (4x)
IFD	83f-i	50efg	7.7fgh	33.7de
IFDF	94def	54c-f	6.8gh	32.3ef
IFJAb	90def	56cde	8.3fg	23.0jkl
IFJAm	100bcd	64ab	8.2fg	32.0ef
IFJAn1	100bcd	57b-e	9.2ef	25.0h-k
IFJAn2	109abc	58bcd	8.3fg	29.0fg
IFJK	97cde	60abc	8.8ef	24.3i-l
IFJKh	74g-k	46g-k	14.0a	64.3a
IFJKMes	59l	39k	13.0a	64.0a
CuL	68kl	40ijk	12.0bc	65.0a
MX	74h-k	40jk	12.3bc	47.0b
IHRA1	111ab	57b-e	6.3h	21.0l
IHRA2	87d-g	56cde	7.7fgh	21.7kl
IHRA3	82f-j	51d-g	8.2fg	28.0gh
DepL	83f-i	47f-i	9.2ef	27.0ghi
TL	85e-h	47g-j	10.3de	25.7g-j
BL	120a	67a	7.7fgh	29.0fg
IAC	113a	67a	7.8fgh	37.0d

میانگین‌هایی، در هر ستون، که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار، تفاوت معنی‌دار ندارند.

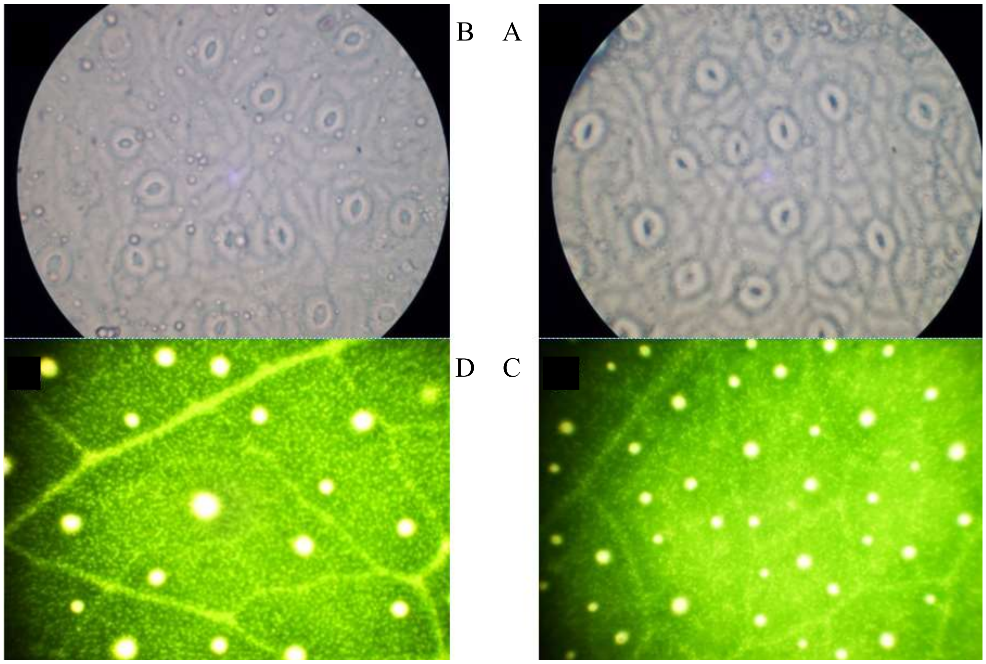
Means, in each column, followed by at least one letter in common are not significantly different- Using Least Significant Difference Test.

* برای اختصارات به جدول ۱ مراجعه شود.

* For abbreviations refer to Table 1.

تراکم روزنه

بیشترین تعداد روزنه در بزرگنمایی صد برابر میکروسکوپ (۰/۲۵ سانتی‌مترمربع)، مربوط به برگ خارکُل و نوع موسوم به مصری (به ترتیب ۱۴/۰ و ۱۳/۰ روزنه) بود. در رده بعدی مکزیکن‌لایم قرار داشت که به‌طور میانگین ۱۲/۳ روزنه در واحد سطح داشت (شکل ۲A و ۲B). ژنوتیپ‌های منسوب به پرشین‌لایم به‌طور میانگین بین ۶/۳ تا ۱۰/۳ روزنه در واحد سطح داشتند که به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه اول بود (جدول ۴). در این رابطه همبستگی منفی بسیار معنی‌داری ($r = -۰/۹۰۱^{**}$) بین تعداد روزنه و سطح پلوئیدی وجود داشت (نتایج ارائه نشده است).



شکل ۲- تراکم روزنه و کیسه‌های ترشحی در برگ مکزیکن‌لایم (A و C) به‌عنوان ژنوتیپ دیپلوئید و تاهیتی‌لایم (B و D) به‌عنوان ژنوتیپ تریپلوئید

Fig. 2. Stomatal and secretary sac density in leaf of Mexican lime (A and C) as diploid and Tahiti lime (B and D) as triploid genotypes

به طوری که ژنوتیپ‌های تریپلوئید تعداد روزنه کمتری در واحد سطح برگ داشتند.

تراکم کیسه ترشحی

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تعداد کیسه ترشحی در بزرگنمایی چهار برابر میکروسکوپ (۰/۲۵ سانتی‌مترمربع)، در برگ بالغ لیموی‌خیاری، خارکُل و نوع موسوم به مصری (به ترتیب ۶۵/۰، ۶۴/۳ و ۶۴/۰ کیسه ترشحی) بطور معنی‌دار بیشتر بود (جدول ۴). در رده بعدی مکزیکن‌لایم قرار داشت که به‌طور میانگین ۴۷/۰ کیسه ترشحی در واحد سطح داشت. ژنوتیپ‌های لیمو منسوب به پرشین‌لایم به‌طور میانگین بین ۲۱/۰ تا ۳۷/۰ کیسه ترشحی در واحد سطح داشتند که به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه اول بود (جدول ۴- شکل ۲C و ۲D). در این رابطه همبستگی منفی معنی‌داری ($r = -۰/۹۲۸^{**}$) بین تعداد کیسه‌های ترشحی و سطح پلوئیدی مشاهده شد (نتایج ارائه نشده است). به طوری که ژنوتیپ‌های دیپلوئید تعداد کیسه ترشحی بیشتری در واحد سطح برگ داشتند.

در پژوهش حاضر، میانگین محتوای DNA در گیاهان دیپلوئید ۰/۷۹۳ و در گیاهان تریپلوئید

۱/۱۸۴ پیکوگرم بود. به‌طور کلی، نسبت محتوای DNA در تیپ های تریپلوئید به دیپلوئید برابر ۱/۴۹۳ بود. با توجه به این که محتوای ژنوم در گیاهان تریپلوئید ۱/۵ برابر محتوای ژنوم در گیاهان دیپلوئید است، می‌توان نتایج حاصل از گروه‌بندی دیپلوئید و تریپلوئید را قابل قبول دانست.

در مطالعات انجام‌شده مشابه قبلی در مرکبات نیز، براساس نسبت محتوای DNA نمونه مجهول به نمونه معلوم و یا براساس شاخص DNA سطح پلوئیدی گیاهان مورد بررسی تخمین زده شد. به طوری که با در دست داشتن محتوای DNA گیاه استاندارد تریپلوئید (تاهیتی‌لایم)، سطح پلوئیدی پایه‌های دانهالی نارنج سه‌برگ، نارنج، رافلمون، ولکامرلمون، کلئوپاترامانداراین، هیوکان، سانبوکان، کین‌کوجی، کاریزو سیترنج و سووینگل‌سیتروملو را دیپلویید گزارش شده است (Seker *et al*., 2003). آن‌ها مقدار DNA هسته‌ای تاهیتی‌لایم را ۱/۱۷۰ پیکوگرم و مقدار DNA هسته‌ای پایه‌های مورد بررسی را از ۰/۹۸۴ پیکوگرم در گونه هیوکان تا ۰/۶۷۸ پیکوگرم در نارنج سه‌برگ برآورد کردند.

در یک پژوهش نارنگی بندیزائو (*Citrus reticulata*) به‌عنوان نمونه استاندارد دیپلوئید مورد استفاده قرار گرفت و سطح پلوئیدی نتاج حاصل از گیاهان تریپلوئید BHR (حاصل از تلاقی نارنگی بندیزائو و یک گیاه تتراپلوئید حاصل از تلاقی پرتقال هاملین و رافلمون) به روش فلوسایتومتری ارزیابی و گزارش شد ۵۲/۳ درصد نتایج تریپلوئید، ۳۵/۷ درصد آن‌ها دیپلوئید و مابقی آنیوپلوئید و تتراپلوئید بودند (Zhu *et al*., 2009). در بسیاری از آزمایش‌ها که روی گیاهان مختلف از جمله مرکبات انجام شده است، هدف افزایش مصنوعی سطح پلوئیدی با استفاده از تیمار کلشی‌سین بوده است. در همه این پژوهش‌ها، پس از استفاده از تیمار کلشی‌سین، سنجش سطح پلوئیدی گیاهان حاصل، با استفاده از روش فلوسایتومتری انجام شده است (Kainth and Grosser, 2010).

نتایج مربوط به ویژگی‌های برگ نشان داد که ژنوتیپ‌های منسوب به پرشین‌لایم، طول و عرض برگ بیشتری نسبت به بقیه ژنوتیپ‌های مورد بررسی داشتند. البته این مورد به میزان زیادی به مکان نمونه‌گیری وابسته بود. به عنوان مثال، برخی ژنوتیپ‌های منسوب به پرشین لایم (IAC و بیرس‌لایم) به‌ترتیب از پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری رامسر و شرکت باغداری فجر ساری تهیه شده بود. به‌طور کلی اندازه برگ مرکبات در شمال ایران بزرگ‌تر از جنوب ایران است که دلیل آن تعادل بیشتر دما و تابش کمتر آفتاب می‌باشد. زیرا سطح برگ گیاهان در تابش کمتر آفتاب افزایش می‌یابد (Ziveak *et al*., 2014).

در پژوهش حاضر، میانگین طول و عرض برگ در ژنوتیپ‌های تریپلوئید بیشتر از دیپلوئید بود. این نتایج با یافته های پادوان و

همکاران (Padoan *et al.*, 2013) مغایرت داشت. البته در پژوهش آن‌ها مقایسه بین گیاهان دیپلوئید و تریپلوئید یک گونه گیاهی (نارنگی کلمانتین) انجام شده بود. کوون و همکاران (Kwon *et al.*, 2015) نیز گزارش نمودند که طول برگ در گیاهان دیپلوئید *Prunella vulgaris* به‌طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان تتراپلویید بود. با این حال به طور مکرر گزارش شده است که پلی‌پلوئیدی اندازه و سطح برگ را افزایش می‌دهد (Ye *et al.*, 2010).

نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های دیگر محققان (Hosseini *et al.*, 2014; Ye *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2009; Yahata *et al.*, 2005) که مبین بالاتر بودن ابعاد برگ در گیاهان تریپلوئید نسبت به دیپلوئید بود، مطابقت دارد. به‌نظر می‌رسد لغت latifolia به عنوان صفت گونه‌ای پرشین‌لایم، از کلمه Latiofoliate به معنی برگ پهن اقتباس شده است (Anonymous, 2003). به‌همین دلیل گونه‌هایی از مرکبات که به نام پرشین‌لایم یا تاهیتی‌لایم معروف هستند، با نام علمی *Citrus latifolia* شناخته می‌شوند.

در پژوهش حاضر، مشخص شد که ژنوتیپ‌های تریپلوئید تعداد روزنه کمتری نسبت به ژنوتیپ‌های دیپلوئید در واحد سطح برگ داشتند (جدول ۴، شکل ۲A و ۲B) که با یافته‌های دیگر محققان (Hosseini *et al.*, 2014; Padoan *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2009) همخوانی داشت. گزارش شده است که با افزایش سطح پلوئیدی، تعداد روزنه در واحد سطح برگ کاهش ولی اندازه سلول محافظ روزنه افزایش می یابد (Kwon *et al.*, 2015; Padoan *et al.*, 2013; Yahata *et al.*, 2005). اندازه سلول‌های محافظ روزنه در گیاهان دیپلوئید به‌طور معنی‌داری کوچک‌تر از گیاهان تریپلوئید می‌باشد. همچنین تراکم روزنه در گیاهان دیپلوئید (۷-۶) بیشتر از گیاهان تریپلوئید (۴-۳) بود (Padoan *et al.*, 2013).

هماهنگی اندازه و تراکم روزنه یک ویژگی مهم در افزایش کارایی مصرف آب است. در شرایط محیطی خشک، روزنه‌های کوچک واکنش سریعی به تنش آبی نشان می‌دهند و از طرفی تراکم زیاد روزنه، در شرایط مطلوب برای فتوسنتر، منجر به حداکثر انتشار گاز کربنیک می‌شود. افزایش تراکم روزنه با هدایت روزنه‌ای و سرعت تعرق بیشتر همراه است، که برای انتقال آب و مواد غذایی از مسیر طولانی آوندهای چوبی ضروری است.

روزنه‌های کوچک منجر به مقاومت بیشتر و کنترل روزنه‌ای در شرایط تنش آبی می‌شود. تغییر در مورفولوژی برگ و کاهش تراکم روزنه، به‌طور معنی‌داری افت آب از برگ‌ها را در گیاهان تریپلوئید مرکبات نسبت به گیاهان دیپلوئید کاهش می‌دهد (Padoan *et al.*, 2013). همچنین گزارش شده

است که تراکم روزنه در برگ گیاهان تتراپلوئید لیموترش به طور معنی‌داری کمتر از برگ گیاهان دیپلوئید بود. به عقیده آن‌ها دلیل کاهش تراکم روزنه در گیاهان تتراپلوئید، افزایش اندازه سلول‌ها در گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید و در نتیجه کاهش تراکم روزنه در واحد سطح بود (Afshar-Mohammadian *et al*., 2013).

ژنوتیپ های لایم منسوب به پرشین‌لایم به‌طور میانگین بین ۲۱/۰ تا ۳۷/۰ کیسه ترشحی در واحد سطح داشتند که به‌طور معنی‌داری کمتر از گیاهان دیپلوئید بود. نتایج فوق با یافته های یک پژوهش روی لیموترش مطابقت دارد (Afshar-Mohammadian *et al*., 2013). نتایج این پژوهش نشان داد که تراکم کیسه‌های ترشحی در برگ گیاهان تتراپلوئید لیموترش به طور معنی‌داری کمتر از برگ گیا هان دیپلوئید بود. کیسه‌های ترشحی از طریق تحلیل رفتن یک یا چند سلول در لابلای سلول ها ایجاد می شود. بزرگتر بودن کیسه‌های ترشحی (نا شی از کاهش تراکم آن‌ها در واحد سطح برگ) در برگ مرکبات تریپلوئید نسبت به مرکبات دیپلوئید، می‌تواند ناشی از بزرگتر بودن سلول‌های گیاهان تریپلوئید باشد (Afshar-Mohammadian *et al*., 2013).

نتیجه‌گیری

در مناطق جنوبی ایران با شیوع بیماری جاروک لیموترش در دهه ۷۰، بخش عمده درختان لیموترش (مکزیکن‌لایم) آلوده شدند و با توجه به حساسیت این گونه مرکبات به فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک، تاکنون سطح زیرکشت قابل ملاحظه‌ای از لیموترش منطقه از بین رفته است.

پرشین‌لایم (*Citrus latifolia* Tanaka) در طبیعت و نیز در آزمایش های مایه‌زنی، علایم بیماری جاروک نشان نداده است و به‌عنوان یک منبع تحمل مطرح می‌باشد. با توجه به این که گیاهان با سطوح پلوئیدی بالاتر، تحمل بیشتری نسبت به گیاهان با سطوح پلوئیدی کمتر در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده دارند (Lavania, 2005)، شاید بتوان تحمل نسبی پرشین‌لایم به بیماری جاروک لیموترش را به تریپلوئید بودن آن نسبت داد.

در چند سال اخیر، با توجه به تقاضای باغداران جنوب ایران، توسعه کشت پرشین‌لایم در دستور کار قرار گرفته است و تولیدکنندگان نهال اقدام به تولید این گونه مرکبات روی پایه‌های مختلف کرده‌اند. در جنوب ایران، مخصوصاً استان های فارس و هرمزگان، پرشین‌لایم در مواردی با نام لیمومصری شناخته می‌شود. لیمومصری (Egyptian lime) در اصل یک دانهال حاصل از مکزیکن‌لایم است که به‌دلیل درشت‌بودن میوه‌هایش، شباهت‌های ظاهری با پرشین‌لایم دارد (USDA, 2002). براساس پژوهش‌های انجام شده توسط نگارندگان، این نوع مرکبات در ایران وجود

ندارد و ژنوتیپی از لیموترش که در منطقه جهرم فارس به این نام شناخته می‌شود، در واقع یک ژنوتیپ حاصل از دانهال‌های جنسی مکزیکن‌لایم است و اتلاق نام مصری به این نوع لیموترش اشتباه است.

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در پژوهش حاضر، نوع موسوم به مصری، خارکُل و لیموی‌خیاری همگی دیپلوئید بوده و کشت آن‌ها با عنوان مصری یا پرشین‌لایم در مناطق آلوده به جاروک لیموترش قابل توصیه نمی‌باشد. همچنین به‌کار بردن واژه لیمومصری به‌جای پرشین‌لایم، به اصالت تاریخی این رقم، که در دنیا با عنوان لیموی‌ایرانی شناخته می‌شود، خدشه وارد می‌کند.

سپاسگزاری

نگارندگان از محققان محترم بخش ذخایر توارثی و بانک ژن گیاهی ملی ایران و مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، بویژه آقای دکتر عباسی‌کوهپایگانی و آقای مهندس بکایی به‌دلیل راهنمایی در استفاده از دستگاه فلوسایتومتری کمال تشکر را دارند.

References

Afshar-Mohammadian, M., Omidi, Z., Purakbari-kasmaei, R., and Asadi-Abkenar, A. 2013. The effect of polyploidy on some anatomical and antioxidant characteristics of *Citrus aurantifolia*. Journal of Plant Researches (Iranian Journal of Biology) 26(3): 238-246 (in Persian)

Aleza, P., Juarez, J., Cuenca, J., Ollitrault P., and Navarro, L. 2010. Recovery of citrus triploid hybrids by embryo rescue and flow cytometry from 2X × 2X sexual hybridization and its application to extensive breeding programs. Plant Cell Report 29: 1023-1034.

Anonymous. 2003. Narcis dictionary. Computer Software. www.narcissoft.com.

Bakhshi, B., Aghaei M. J., Bihamta M. R., Darvish, F., and Zarifi, E. 2010. Ploidy determination of *Aegilops cylindrica* host accessions of Iran by using flow cytometry and chromosome counting. Iranian Journal of Botany 16(2): 258-266.

Cantuarias-Avilés, T., Filhoa, F. A. A. M., Stuchi, E. S., Da-Silva, S. R., Espinosa-Nuneza, E., and Neota, H. B. 2012. Rootstocks for high fruit yield and quality of ‘Tahiti’ lime under rainfed conditions. Scientia Horticulturae 142: 105-111.

Cottin, R. 2002. Citrus of the world: a citrus directory. Version 2.0. France: SRA INRACIRAD. 62 pp.

Curk, F., Ollitrault, F., Garcia-Lor, A., Luro, F., Navarro, L., and Ollitrault, P.

2016. Phylogenetic origin of limes and lemons revealed by cytoplasmic and nuclear markers. Annals of Botany: 1-19.

Germana, M. A., Germana, M. P., Motisi, A., and Sottile, F. 2002. Research on stomata frequency and size in several citrus species. Pp. 100-102. In: Proceedings of 7th International Citrus Congress, International Society of Citriculture.

Ghanavati, F., and Eskandari, H. 2011. Relationship between the chloroplast number in stomatal guard cells, flow cytometry and ploidy level in *Onobrychis* spp. Seed and Plant Improvement Journal 27(3): 427-439 (in Persian)

Golein, B., Rabiei, V., Mirabbasi, F., Fifaei, R., and Hallaji-Sani, M. F. 2015. Effect of salinity stress on physiology and biochemistry characteristics of citrus genotypes. Journal of Horticultural Science 29(3): 416-425 (in Persian)

Gu, X. F., Yang, A. F., Meng, H., and Zhang, J. R. 2005. In vitro induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujube* Mill. cv. Zhanhua. Plant Cell Report 24: 671-676.

Hodgson, R. W. 1967. Horticultural varieties of Pp. 431-592. In: Reuther, W., Webber, H. J. and Batchelor, L. D (eds.). The citrus industry, Volume I. University of California Press.

Hosseini, H. R., Chehrazi, M., Nabati-Ahmadi, D., and Mahmoodi-Soorestani, M. 2014. Induction of auto-tetraploidy in Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* cv. Rosea) by colchicine treatment in order to induce diversity of morph-physiological and phenology traits. Journal of Plant Process and Function 3(9): 1-10 (in Persian)

Jaskani, M. J., Khan, M. M., and Khan, I. A. 2002. Growth, morphology and fruit comparison of diploid and tetraploid Kinnow mandarin. Pakistan Journal of Agriculture Sciences 39: 126-128.

Kainth, D., and Grosser, J. W. 2010. Induction of auto-tetraploids in pummelo (*Citrus grandis* L. Osbeck) through colchicine treatment of meristematically active seeds *In vitro*. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 123: 44-48.

Kwon, S. J., Roy, S. K., Cho, K. Y., Moon, Y. J., Woo, S. H., and Kim, H. H. 2015. Effect of Colchicine on the induction of *Prunella vulgaris* for. *albiflora* Nakai. Korean Journal of Crop Science 60(1): 107-113.

Lavania, U. C. 2005. Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phyto-pharmaceuticals. Plant Genetic Research 3: 170-177.

Longley, A. E. 1925. Polycarpy, polyspory and polyploidy in citrus and citrus relatives.

The Washington Academy of Science 15: 347-357.

Malekzadeh-Shafaroodi, S., Ghani, A., Habibi, M., and Amiri, A. 2011. Evaluation the possibility of polyploidy induction in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) by colchicine treatment. Journal of Horticultural Science 25(4): 461-469 (in Persian)

Padoan, D., Mossad, A., Chiancone, B., Germana, M. A., and Valli Khan, P. S. S. 2013. Ploidy levels in *Citrus clementine* affect leaf morphology, stomatal density and water content. Theoretical and Experimental Plant Physiology 25(4): 283-290.

Salehi, M., Nejat, N., Tavakoli, A. R., and Izadpanah, K. 2005. Reaction of citrus cultivars to *Candidatus* Phytoplasma aurantifolia in Iran. Journal of Plant Diseases 41: 363-376 (in Persian)

Seker, M., Tuzcu, O., and Ollitrault, P. 2003. Comparison of nuclear DNA content of citrus rootstock populations by flow cytometry analysis. Plant Breeding 122: 169-172.

Shahriari-Ahmadi, F., Dehghan, E., Farsi, M., and Azizi, M. 2008. Tetraploid induction of *Hyoscyamus muticus* L. using colchicine treatment. Pakistan Journal of Biological Sciences 11: 2653-2659.

Singh, A., Nagvi, S. A. M. H., and Singh, S. 2002. Citrus germplasm, cultivars and rootstocks. Kalyani Publishers, New Delhi. 166 pp.

USDA. 2002. Citrus variety collection: Egyptian lime. University of California Riverside, CRC 2883, PI 185427. https://citrusvariety.mcr.edu./Citrus/egyption.html.

Yahata, M., Harosaki, S., Komatsu, H., Takami, K., Kunitake, H., Yabuya, T., Yamashita, K., and Toolapong, P. 2005. Morphological characterization and molecular verification of a fertile haploid pummel (*Citrus grandis* Osbeck). American Society for Horticultural Science 130(1): 34-40.

Ye, Y. M., Tong, J., Shi, X. P., Yuan, W., and Li, G. R. 2010. Morphological and cytological studies of diploid and Colchicine-induced tetraploid lines of crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). Scientia Horticulturae 124: 95-101.

Yuan, S. X., Liu, Y. M., Fang, Z. Y., Yang, L. M., Zhuang, M., Zhang, Y. Y., and Sun, P. T. 2009. Study on the relationship between the ploidy level of microspore-derived plants and the number of chloroplasts in stomatal guard cells in *Brassica oleracea*. Agricultural Sciences in China 8: 939-946.

Zhu, S. P., Song, J. K., Hu, Z. Y., Tan, B., Xie, Z. Z., Yi, H. L., and Deng, X. X. 2009.

Ploidy variation and genetic composition of open-pollinated triploid citrus progenies. Botany Studies 50: 319-324.

Ziveak, M., Brestic, M., Kalaji, H. M., and Govindjee, Kh. 2014. Photosynthetic responses of sun- and shade-grown barley leaves to high light: is the lower PSII connectivity in shade leaves associated with protection against excess of light? Photosynthetic Research 119: 339-354.